

E A K J

09/673198  
PCT/JP 99/01987

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

14.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

REC'D 14 JUN 1999

WIPO PCT

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 8月 5日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第221910号

出 願 人  
Applicant (s):

協和醗酵工業株式会社

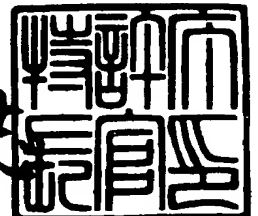
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3033350

特平 10-221910

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-1231N2

【提出日】 平成10年 8月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 微生物によるイソプレノイド化合物の製造方法および抗  
菌または除草活性化合物の探索方法

【請求項の数】 20

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市麻生区王禅寺 2 6 2 5

    【氏名】 三宅 浩一郎

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市成瀬 2 丁目 1 2 - 1

    【氏名】 橋本 信一

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市市ヶ尾町 5 - 1 - 5

    【氏名】 本山 裕章

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市中町 3 - 9 - 1 3

    【氏名】 尾崎 明夫

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都八王子市上野町 1 0 0 - 5

    【氏名】 瀬戸 治男

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区代沢 2 - 1 1 - 5

    【氏名】 葛山 智久

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区西片 1 - 9 - 5

    【氏名】 高橋 俊二

【特許出願人】

【識別番号】 000001029  
【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社  
【代表者】 平田 正

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第103101号  
【出願日】 平成10年 4月14日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物によるイソプレノイド化合物の製造方法および抗菌または除草活性化合物の探索方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (f) から選ばれる DNA を 1 つ以上含む DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法。

(a) ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする DNA

(b) ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードする DNA

(c) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA

(e) 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする DNA

(f) (a)、(b)、(c)、(d) および (e) から選ばれる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれた DNA にコード



された蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードするDNA

【請求項2】 ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAが、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 DNAが、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または2記載の製造法。

【請求項4】 ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNAが、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシルピロリン酸合成酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項5】 DNAが、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または4記載の製造法。

【請求項6】 1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAが、配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項7】 DNAが、配列番号10記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または6記載の製造法。

【請求項 8】 DNA が、配列番号 8 または 9 記載の塩基配列から選ばれる塩基配列を有する DNA である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 9】 イソプレノイド化合物が、ユビキノン、ビタミン K 2 およびカロテノイドから選ばれるイソプレノイド化合物である、請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 10】 以下の (a)、(b) および (c) から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質。

(a) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(c) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

【請求項 11】 請求項 10 記載の蛋白質をコードする DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造法。

【請求項 12】 形質転換体が、Escherichia 属に属する微生物または Erwinia 属に属する微生物である、請求項 1 または 11 記載の製造法。

【請求項 13】 以下の (a) ～ (g) いずれかに記載の、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(a) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA

(b) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA

(c) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA

- (d) 配列番号 8 記載の塩基配列を有する DNA
- (e) 配列番号 9 記載の塩基配列を有する DNA
- (f) 配列番号 10 記載の塩基配列を有する DNA
- (g) (a) ~ (f) いずれかに記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA

【請求項 14】 ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸より 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする抗菌活性を有する物質の探索法。

【請求項 15】 ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸より 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする除草活性を有する物質の探索法。

【請求項 16】 蛋白質が、以下の (a) または (b) の蛋白質であることを特徴とする、請求項 14 または 15 記載の探索方法。

(a) ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質

(b) 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質

【請求項 17】 ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質が、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有

する蛋白質である、請求項 16 記載の探索法。

【請求項 18】 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質が、配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質である、請求項 16 記載の探索法。

【請求項 19】 請求項 14 記載の探索法により取得される抗菌活性を有する物質。

【請求項 20】 請求項 15 記載の探索法により取得される除草活性を有する物質。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、原核生物由来の形質転換体を用いたイソプレノイド化合物の製造法、ならびに非メバロン酸経路に係わる抗菌または除草活性物質の探索方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

イソプレノイドとは、炭素数 5 のイソプレン単位を基本骨格に持つ化合物の総称で、イソペンテニルピロリン酸 (IPP) の重合によって生合成される。自然界には多種多様なイソプレノイド化合物が存在しており、人類にとって有用なものも多い。

##### 【0003】

例えば、ユビキノンは電子伝達系の必須成分として、生体内で重要な機能を果たしており、心疾患に効果のある医薬品として使用されているほか、欧米では健康食品としての需要が増大している。

ビタミン K は血液凝固系に関与する重要なビタミンであり、止血剤として利

用されているほか、最近骨代謝への関与が示唆され、骨粗鬆症治療への応用が期待されており、フィロキノンとメナキロンは医薬品として許可されている。

【0004】

また、ユビキノンやビタミンK類には貝類の付着阻害作用があり、貝類付着防止塗料への応用が期待される。

さらに、カロテノイドと呼ばれる炭素数40のイソプレレン骨格を基本とする化合物は抗酸化作用があり、 $\beta$ -カロチン、アスタキサンチン、クリプトキサンチンなど、がん予防や免疫賦活活性を有するものとして期待されているものもある。

【0005】

このように、イソプレノイド化合物には多くの有用物質が含まれており、これらの安価な製造法が確立されれば、社会的にも医学的にも多大な恩恵があると思われる。

発酵法によるイソプレノイド化合物の生産は以前から検討されており、培養条件の検討や変異処理による菌株育種、さらに遺伝子工学的手法による生産量の向上への試みもなされている。しかし、その効果は個々の化合物種に限定されており、イソプレノイド化合物全般に効果のある方法は知られていない。

【0006】

イソプレノイド化合物の基本骨格単位であるイソペンテニルピロリン酸 (IPP) は、動物や酵母などの真核生物ではアセチルCoAからメバロン酸を經由して生合成される (メバロン酸経路) ことが証明されている。

メバロン酸経路では3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA (HMG-CoA) リダクターゼが律速と考えられており [Mol. Biol. Cell, 5, 655(1994)]、酵母において、HMG-CoAリダクターゼを高発現化させカロテノイドの生産性を上げる試みがなされている [三沢ら カロテノイド研究談話会講演要旨集(1997)]。

【0007】

原核生物ではメバロン酸経路の存在を証明した知見はなく、別の経路、即ち、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸が縮合して生じる1-デオキシ

1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を経由してIPPが生合成されるという非メバロン酸経路が多く、原核生物において発見されており[Biochem. J., 295, 517 (1993)]、<sup>13</sup>Cラベル化基質を使った実験から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸は2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を経由してIPPへと転換されることが示唆されている[Tetrahedron Lett. 38, 4769 (1997)]。

【0008】

大腸菌において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸を縮合させ1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生合成させる酵素1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸合成酵素(DXS)をコードする遺伝子が同定されている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)]。該遺伝子は、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするispAを含む4つのORFからなるオペロンに含まれている。

【0009】

更に、大腸菌においては、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸に変換する活性が存在することが知られている[Tetrahedron Lett. 39, 4509 (1998)]。

該オペロンに含まれるこれら遺伝子を操作して、イソプレノイド化合物の生産性を向上させることに関する記載も示唆も現時点ではない。

【0010】

原核生物における非メバロン酸経路に関する知見は徐々に蓄積されつつあるが、関与する酵素やそれをコードする遺伝子の多くは未だ不明である。

光合成細菌において、コリスメートを4-ヒドロキシベンゾエートへ転換する酵素ubiCの遺伝子(ubiC遺伝子)およびp-ヒドロキシベンゾエートトランスフェラーゼの遺伝子(ubiA)を導入することにより、ユビキノール-10を効率的に生産する方法が知られている(特開平8-107789)が、非メバロン酸経路の酵素遺伝子を操作することによってイソプレノイド化合物の生産性を向上させた例は皆無である。

更に、非メバロン酸経路上の反応を、変異または薬剤処理等により阻害する

ことにより、原核生物がいかなる影響を受けるかに関する知見はない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関与するDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法、該蛋白質および該蛋白質をコードするDNAを提供することにある。さらに、本発明の課題は、非メバロン酸経路上の酵素反応を阻害する物質を探索することを特徴とする、抗菌および除草活性物質の探索方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、原核生物によるイソプレノイド生産性を向上させることのできるDNAを検索し、得られたDNAを原核生物に導入することにより、イソプレノイド生産性を向上させることのできることを見出し本発明を完成するに至った。

【0013】

即ち、本願の第1の発明は、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)から選ばれるDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノ

イド化合物の製造法である。

【0014】

(a) はピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNA、

(b) はファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNA、

(c) は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(d) は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(e) は1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(f) は(a)、(b)、(c)、(d)および(e)から選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれたDNAにコードされた蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードするDNAである。

【0015】

本明細書中の、アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0016】



かかる 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質は、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第二版〔サンプブルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989 年刊 (以下、モレキュラー・クローニング 第二版と略す)〕、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

## 【0017】

上記において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードする DNA として、例えば、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする DNA 等をあげることができる。

具体的な例として、配列番号 6 記載の塩基配列を有する DNA 等をあげることができる。

## 【0018】

ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードする DNA として、例えば、配列番号 2 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシルピロリン酸合成酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA をあげることができる。具体的な例として、配列番号 7 記載の塩基配列を有する DNA 等をあげることができる。

【0019】

配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号8記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号9記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0020】

1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAとして、例えば、配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA等をあげることができる。

該DNAの具体的な例として、配列番号10記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0021】

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記のDNAまたは該DNAの断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍程度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0022】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング 第二版等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして、具体的には配列番号1、2、3、4および5から選ばれる塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有するDNA、好ましくは90%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0023】

イソプレノイド化合物として、例えば、ユビキノン、ビタミンK2、カロテノイド等をあげることができる。

本願の第2の発明は、以下の(a)、(b)および(c)から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質である。

【0024】

(a) は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(c) は配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質である。

【0025】

本願の第3の発明は、上記の第2の発明に記載の蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することの特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造法である。

【0026】

上記において、形質転換体として、Escherichia属に属する微生物またはErwinia属に属する微生物をあげることができる。

本願の第4の発明は、以下の(a)、(b)、(c)および(d)から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAである。

【0027】

(a) は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、  
(b) は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、  
(c) は配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、  
(d) は配列番号8記載の塩基配列を有するDNA、  
(e) は配列番号9記載の塩基配列を有するDNA、  
(f) は配列番号10記載の塩基配列を有するDNA、  
(g) は(a)～(f)いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAである。

【0028】

本願の第5の発明は、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする抗菌活性を有する物質の探索法である。

【0029】

本願の第6の発明は、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする除草活性を有する物質の探索法である。

【0030】

上記発明 5 および 6 において、蛋白質として、以下の (a) または (b) の蛋白質をあげることができる。

(a) はピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質、

(b) は 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質である。

#### 【0031】

上記において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質として、例えば、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をあげることができる。

#### 【0032】

1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質として、例えば、配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をあげることができる。

#### 【0033】

本発明の第 7 の発明は、上記第 5 の発明の探索法により取得される抗菌活性を有する物質である。

本発明の第 8 の発明は、上記第 6 の発明の探索法により取得される除草活性を有する物質である。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0034】

【発明の実施の形態】

I. イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

(1) DXSをコードするDNA (DXS遺伝子) の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得既に決定されている、大腸菌の染色体およびDXS遺伝子の塩基配列情報 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)] を利用し、大腸菌よりDXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域をPCR法 [Science, 230, 1350 (1985)] によりクローニングし、取得することができる。DXS遺伝子を含む塩基配列情報として、例えば、配列番号11に記載の塩基配列をあげることができる。

【0035】

DXS遺伝子を含むDNA領域の取得法としては、具体的には以下の方法をあげることができる。

大腸菌、例えばE. coli XL1-Blue株 (東洋紡より購入可能) を大腸菌に適した培地、例えばLB液体培地 [バクトトリプトン (ディフコ社製) 10g、酵母エキス (ディフコ社製) 5g、NaCl 5gを水1リットルに含みpH 7.2に調整した培地] を用い常法に従って培養する。

【0036】

培養後、培養物より遠心分離により菌体を取得する。

取得した菌体より公知の方法 (例えば、モレキュラー・クローニング 第二版) に従い染色体DNAを単離する。

配列番号11に記載された塩基配列情報を利用し、DXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域に対応する塩基配列を含有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成する。

【0037】

PCR法により増幅後、該増幅DNA断片をプラスミドに導入可能なように

センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端には適切制限酵素サイト、例えばB a mH I、E c oR I等の制限酵素サイトを付加させることが好ましい。

## 【0038】

該センスプライマー、アンチセンスプライマーの組合せとしては、例えば、配列番号12および13、配列番号14および15、配列番号12および16、配列番号17および18、配列番号19および13、配列番号22および23の組合せの塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

## 【0039】

染色体DNAを鋳型として、これらプライマー、TaKaRa LA-PCR<sup>TM</sup> Kit Ver.2(宝酒造社製)またはExpand<sup>TM</sup> High-Fidelity PCR System(ペーリンガー・マンハイム社製)等を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行う。

## 【0040】

PCRの条件として、上記プライマーが2kb以下のDNA断片の場合には94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片の場合には98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件をあげることができる。

## 【0041】

該増幅されたDNA断片を、大腸菌で増幅可能な適切なベクターを上記プライマーで付与した制限酵素サイトと同じサイトで切断後、アガロース電気泳動、シュークロース密度勾配超遠心分離等の手法によりDNA断片を分画・回収する。

該回収DNA断片を用い、常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA

Synthesis and Plasmid Cloning (ライフ・テクノロジーズ社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit [ストラタジーン (Staratagene) 社製] を用いクローニングベクターを作製し、作製した該クローニングベクターを用い、大腸菌、例えば E. coli DH5 $\alpha$  株 (東洋紡より購入可能) を形質転換する。

【0042】

該大腸菌を形質転換するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 $\lambda$ TriplEx (クローンテック社製)、 $\lambda$ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [H.Okayama and P.Berg; Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218 (和光純薬社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN 社製) 等をあげることができる。

【0043】

得られた形質転換株より、目的とする DNA を含有したプラスミドを常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等に記載された方法により取得することができる。

【0044】

該方法により、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードする DNA、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードする DNA、配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA 等を有するプラスミドおよびこれら DNA を 1 つ以上含むプラスミドを取得することができる。



【0045】

該プラスミドとして、例えば、上記DNAを全て含むプラスミドpADO-1、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpDXS-1あるいはpQEDXS-1、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpISP-1、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpXSE-1、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpTFE-1等をあげることができる。

【0046】

これらプラスミドに挿入された大腸菌由来のDNA断片の塩基配列を利用し、他の原核生物、例えば、Rhodobacter属に属する微生物等より、該DNAのホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

(2) 大腸菌のメチルエリスリトール要求性変異株を相補することのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA (メチルエリスリトール要求性相補遺伝子) の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

大腸菌、例えばE. coli W3110株 (ATCC14948) を、常法に従って培養する。

【0047】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得する。

該菌体を、適切な緩衝剤、例えば、0.05M トリスマレイン酸緩衝液 (pH6.0) 等で洗浄後、菌体濃度が $10^4 \sim 10^{10}$ 細胞/mlになるように同緩衝液に懸濁する。

【0048】

該懸濁液を用いて常法により変異処理を行う。常法として、例えば、該懸濁液にNTGを終濃度が600mg/lになるように加え、室温で20分間保持して変異処理する方法をあげることができる。

該変異処理懸濁液を最少寒天培地に0.05~0.5%メチルエリスリトールを添加した培地で培養する。

【0049】

最少寒天培地として、例えば、M9培地（モレキュラー・クローニング 第二版）に寒天を添加した培地等をあげることができる。

メチルエリスリトールは、Tetrahedron Letters, 38, 35, 6184 (1997)に記載の方法に準じて化学合成したものを用いることができる。

【0050】

培養後、生育し形成されたコロニーを、最少寒天培地とメチルエリスリトールを0.05～0.5%含む最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを含む最少寒天培地では生育できるが、最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択する。

【0051】

該操作により取得されたメチルエリスリトール要求性変異株としてME7株をあげることができる。

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

大腸菌、例えば、E. coli W3110株（ATCC14948）を培養培地、例えば、LB液体培地に植菌し、常法に従って対数増殖期まで培養する。

【0052】

培養後、得られた培養液を遠心分離して菌体を回収する。

得られた菌体より、常法（例えば、モレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法）に従い染色体DNAを単離・精製する。上記（1）に記載の方法で取得される染色体DNAを単離・精製された染色体DNAとして用いることもできる。

【0053】

該染色体DNAの適当量を適切な制限酵素、例えば、Sau3AIで部分消化し、得られた消化DNA断片を、常法、例えば、シュークロース密度勾配超遠心分離（26,000rpm、20℃、20hr）により、サイズ分画する。

該分画により取得される大きさが4～6kbのDNA断片を、適切な制限酵素で消化したベクター、例えば、pMW118（ニッポンジーン社製）にライ

ゲーションすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製する。

【0054】

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたメチルエリスリトール要求性変異株、例えば、ME 7株を常法（例えば、モレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法）に従い形質転換する。

該形質転換体を、ベクターの有する薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加した最少寒天培地、例えば、アンピシリン  $100 \mu\text{g}/1$  入れた M9 寒天培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  で一晚培養する。

【0055】

該方法により、メチルエリスリトール要求性の回復された形質転換体を選択することができる。

得られた該形質転換体より、常法によりプラスミドを抽出する。該メチルエリスリトール要求性を回復させることのできるプラスミドとして、例えば pMEW 73、pQEDXR をあげることができる。

【0056】

該プラスミド中に導入された DNA の塩基配列を決定する。

該方法により決定された塩基配列として、配列番号 10 に示される yaeM 遺伝子の塩基配列を含む配列等をあげることができる。得られた該 yaeM 遺伝子の塩基配列情報を利用して他の原核生物あるいは植物から該 yaeM 遺伝子のホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

【0057】

II. イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造

上記のようにして得られた DNA を宿主細胞中で発現させるためには、まず、目的とする該 DNA 断片を、制限酵素類あるいは DNA 分解酵素類で、該遺伝子を含む適当な長さの DNA 断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記 DNA を挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞中に導入する。

【0058】

宿主細胞としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する細菌、クルイペロミセス属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等をあげることができる。

【0059】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないは染色体中への組込みが可能で、上記目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等を宿主細胞として用いる場合は、上記DNAを発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0060】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもペーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pQE-30（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-)（Stratagene社製）、pTrs30(FERM BP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGEX（Pharmacia社製）、pET-3（Novagen社製）、pTerm2(US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [gene, 33, 103 (1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29（宝酒造社製）、pUC118（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]、pQE-30（QIAGEN社製）等を例示することができる。

【0061】

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター ( $P_{trp}$ )、lacプロモーター ( $P_{lac}$ )、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、 $P_{SE}$ プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。また  $P_{trp}$  を2つ直列させたプロモーター ( $P_{trp} \times 2$ )、tacプロモーター、letIプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

## 【0062】

リボソーム結合配列としては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミッドを用いることが好ましい。

## 【0063】

目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmus属、Streptomyces属、Synneococcus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができ、好ましくは、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmus属、Streptomyces属、Synneococcus属、Zymomonas属に属する微生物等をあげることができる。

## 【0064】

該微生物の具体例として、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5  $\alpha$ 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14297、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Pseudomonas sp. D-0110、Agrobacterium radiobacter、Agrobacterium rhizogenes、Agrobacterium rubi、Anabaena cylindrica、Anabaena doliolum、Anabaena flos-aquae、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Arthrobacter hydrocarboglutamicus、Arthrobacter mysorens、Arthrobacter nicotianae、Arthrobacter paraffineus、Arthrobacter protophormiae、Arthrobacter roseoparaffinus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter ureafaciens、Chromatium buderii、Chromatium tepidum、Chromatium vinosum、Chromatium warmingii、Chromatium fluviatile、Erwinia uredovora、Erwinia carotovora、Erwinia ananas、Erwinia herbicola、Erwinia punctata、Erwinia terreus、Methylobacterium rhodesianum、Methylobacterium extorquens、Phormidium sp. ATCC29409、Rhodobacter capsulatus、Rhodobacter sphaeroides、Rhodopseudomonas blastica、Rhodopseudomonas marina、Rhodopseudomonas palustris、Rhodospirillum rubrum、Rhodospirillum salinarum、Streptomyces ambofaciens、Streptomyces aureofaciens、Streptomyces aureus、Streptomyces fungicid

icus, Streptomyces griseochromogenes, Streptomyces griseus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivogriseus, Streptomyces rameus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces vinaceus, Zymomonas mobilis 等をあげることができる。

【0065】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0066】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13 (ATCC37115)、YEp 24 (ATCC37051)、YEp 50 (ATCC37419)、pHS 19、pHS 15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0067】

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等をあげることができる。

【0068】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci.

i. USA, 75, 1929 (1978))、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【0069】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c DNA I、p c DM 8 (フナコシ社より市販)、p A G E 1 0 7 [特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、p A S 3 - 3 (特開平 2-22 7075)、p C D M 8 [Nature, 329, 840, (1987)]、p c DNA I / A m p (Invitrogen社製)、p R E P 4 (Invitrogen社製)、p A G E 1 0 3 [J. B iochem., 101, 1307 (1987)]、p A G E 2 1 0 等を例示することができる。

【0070】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒト CMV) の I E (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV 40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR  $\alpha$  プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0071】

宿主細胞としては、ナマルバ細胞、H B T 5 6 3 7 (特開昭 63-299)、C O S 1 細胞、C O S 7 細胞、C H O 細胞等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞に DNA を導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-22 7075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]、virology, 52, 456 (1973) に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平 2-22 7075 号公報あるいは特開平 2-25 7891 号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0072】



昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1-38 (1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【0073】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製)等をあげることができる。

【0074】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

【0075】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0076】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

【0077】

上記DNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を製造することができる。

【0078】

本発明のイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0079】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

【0080】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン

スチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

【0081】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0082】

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

【0083】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0084】

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1

～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0085】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔Pharmingen社製〕、Sf-900 II SFM培地（ギブコBRL社製）、ExCell1400、ExCell1405〔いずれもJRH Biosciences社製〕、Grace's Insect Medium〔Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

【0086】

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明の形質転換体の培養物から、本発明のイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

【0087】

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）－セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い

、精製標品を得ることができる。

【0088】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0089】

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0090】

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced chemTech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテック(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

【0091】

### III. イソプレノイド化合物の製造

上記II. で取得された形質転換体を、上記II. の方法に準じて培養し、培養

物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することによりイソプレノイド化合物を製造することができる。

【0092】

該培養により、ユビキノン、ビタミンK<sub>2</sub>、カロテノイド等のイソプレノイド化合物を製造することができる。具体的な例として、例えば、Escherichia 属に属する微生物を形質転換体としたユビキノーン-8やメナキノーン-8の製造、Rhodobacter 属に属する微生物を形質転換体としたのユビキノーン-10の製造、Arthrobacter 属に属する微生物を形質転換体としたビタミンK<sub>2</sub>の製造、Agrobacterium 属に属する微生物を形質転換体としたアスタキサンチンの製造、Erwinia 属に属する微生物を形質転換体としたリコペン、 $\beta$ -カロテン、ゼアキサンチンの製造等をあげることができる。

【0093】

培養終了後、培養液に適当な溶媒を加えてイソプレノイド化合物を抽出し、遠心分離などで沈殿物を除去した後、各種クロマトグラフィーを行うことによりイソプレノイド化合物を単離・精製することができる。

IV. 非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索

(1) 非メバロン酸経路上の酵素活性の測定

非メバロン酸経路上の酵素活性の測定は、通常の酵素の活性測定法に準じて行うことができる。

【0094】

即ち、活性測定の反応液に用いる緩衝液のPHは、目的とする酵素の活性を阻害しないPH範囲であればよく、最適PHを含む範囲のPHが好ましい。

例えば、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、pH5~10、好ましくは6~9である。

【0095】

緩衝液としては、酵素活性を阻害せず、上記pHを達成できるものであればいずれの緩衝液も用いることができる。該緩衝液として、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液、硼酸緩衝液、HEPES緩衝液、MOPS緩衝液、炭酸水素緩衝液などを用いることができる。1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸

レダクトイソメラーゼにおいては、例えば、トリス塩酸緩衝液が好適に用いられる。

【0096】

緩衝液の濃度は酵素活性に障害を及ぼさない限りどのような濃度でも用いることができるが、好適には1 mMから1 Mである。

目的とする酵素に補酵素が必要な場合には、反応液に補酵素を添加する。例えば、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、NADPH、NADHあるいはその他の電子供与体を用いることができ、好ましくはNADPHをあげることができる。

【0097】

添加する補酵素の濃度は、反応を障害しない限りいずれの濃度でも用いることができるが、好適には0.01 mM~100 mM、より好ましくは0.1 mM~10 mMの濃度である。

反応液には必要に応じて金属イオンを添加してもよい。金属イオンは、反応を障害しない限りどのようなものでも添加することができるが、好適には $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ などがあげられる。

【0098】

金属塩として金属イオンを添加することができ、例えば、塩化物や硫酸塩、炭酸塩、リン酸塩などとして添加することができる。

添加する金属イオンの濃度は、反応を障害しない限りどのような濃度でも添加できるが、好適には0 mMから100 mM、より好適には0.1 mMから10 mMである。

【0099】

反応液には、目的とする酵素の基質を添加する。例えば、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を添加する。

基質の濃度は反応に支障のない限りどのような濃度でも用いることができるが、好適には反応液中の濃度は0.01 mM~0.2 Mである。

【0100】

反応に用いる酵素濃度に特に制限はないが、通常 0.01 mg/ml から 100 mg/ml の濃度範囲で反応を行う。

用いる酵素は必ずしも単一にまで精製されている必要はなく、反応を妨害しない限り、他の挟雑蛋白質が混入した標品であってもよい。また、下記(2)の探索においては、該酵素活性を含む細胞抽出液あるいは該酵素活性を有する細胞も用いることができる。

#### 【0101】

反応温度は、目的とする酵素の活性を阻害しない温度範囲であればよく、最適温度を含む範囲の温度が好ましい。即ち、反応温度は、10℃から60℃、より好ましくは30℃から40℃である。

活性の検出は、反応に伴う基質の減少、あるいは反応生成物の増加を、基質あるいは反応生成物を測定できる方法を用いて行うことができる。

#### 【0102】

該方法として、例えば、必要に応じて高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)等により目的物質を分離定量する方法をあげることができる。また反応の進行に伴ってNADHやNADPHが増減する場合には、反応液の340 nmの吸光度を測定することで活性を直接測定することができる。例えば、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、340 nmの吸光の減少を分光光度計で測定することにより反応の進行に伴い減少するNADPHを定量し、活性を検出することができる。

#### 【0103】

##### (2) 非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索

非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索は、上記(1)の酵素活性測定系に被探索物質を加えて同様に反応させ、無添加時より基質の減少量を抑えるような物質あるいは反応産物の生成量を抑えるような物質を探索することで行うことができる。

#### 【0104】

探索の方法としては、基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を経時的に追跡する方法、一定時間反応させた後の基質の減少量あるいは反応生産物の



増加量等を測定する方法等をあげることができる。

基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を経時的に追跡する方法においては、反応中 15 秒～20 分程度の間隔で基質の減少量あるいは反応生産物の増加量を測定することが好ましく、1～3 分間隔で測定することがより好ましい。

【0105】

一定時間反応させた後の基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を測定する方法においては、反応時間は、10 分～1 日が好ましく、より好ましくは 30 分～2 時間である。

非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質は、該非メバロン酸経路を有する微生物および植物の生育を阻害する。該物質が該微生物および植物の生育を阻害することは、本発明者らが始めて見出した。

【0106】

非メバロン酸経路は微生物や植物に存在し、動物や人には存在しないことより、上記探索法により、人や動物に影響を及ぼさない、非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質を取得することができる。

該物質は、有効な抗菌剤あるいは除草剤となり得る。

【0107】

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例で示した遺伝子組換え実験は、特に言及しない限りモレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法（以下、常法と呼ぶ）を用いて行った。

【実施例】

【0108】

実施例 1 イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードする DNA の取得

(1) 大腸菌 D X S 遺伝子の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードする DNA の取得

E. coli XL1-Blue 株（東洋紡より購入）を 1 白金耳、10 ml の LB 液体

培地に植菌し、37℃で一晩培養した。

【0109】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体より、常法に従い染色体DNAを単離・精製した。

配列番号12および13、配列番号14および15、配列番号12および16、配列番号17および18、配列番号19および13の塩基配列の組合せを有する5'末端にBamHIおよびEcoRI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマー、配列番号22および23の塩基配列の組合せを有する5'末端にBamHI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

【0110】

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーと、TaKaRa LA-PCR<sup>TM</sup> Kit Ver.2(宝酒造社製)、Expand<sup>TM</sup> High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)またはTaq DNA polymerase (Boehringer社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマー・ジャパン社製)でPCRを行った。

【0111】

PCRは、2kb以下のDNA断片は94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片は98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

【0112】

PCRにより増幅されたDNA断片のうち、5'末端にBamHIおよびEcoRI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化し、5'末端にBamHI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素BamHIで消化した。

【0113】

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、B a m H I - E c o R I 処理DNA断片およびB a m H I 処理DNA断片を取得した。

lacプロモーターを有する広宿主域ベクターpEG400 [J. Bac., 17, 2392 (1990)] を、制限酵素B a m H I およびE c o R I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、B a m H I - E c o R I 処理pEG400断片を取得した。

【0114】

pUC118 (宝酒造社製) を制限酵素B a m H I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行いB a m H I 処理pUC118断片を取得した。

上記で取得されたB a m H I - E c o R I 処理DNA断片各々についてB a m H I - E c o R I 処理pEG400断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5  $\mu$  l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを各々取得した。

【0115】

該組換え体DNAを用い、E. coli (東洋紡より購入) DH5  $\alpha$  株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をスペクチノマイシン100  $\mu$  g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

生育してきたスペクチノマイシン耐性の形質転換体のコロニー数個について、スペクチノマイシン100  $\mu$  g/mlを含むLB液体培地10mlで37℃16時間振盪培養した。

【0116】

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

【0117】

配列番号6記載の塩基配列を有するDNA、配列番号7記載の塩基配列を有するDNA、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAおよび配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpADO-1、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpDXS-1、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpISP-1、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpXSE-1、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpTFE-1と命名した。

【0118】

また、上記で取得されたBamHI処理DNA断片およびBamHI処理pUC118断片を混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 $\mu$ lの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。以後上記と同様の方法で、大腸菌を形質転換し、該大腸菌よりプラスミドを単離した。

【0119】

上記同様、該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

該プラスミドをBamHI処理し、目的のDNA断片を上記と同様の方法で回収し、発現ベクターpQE30(Qiagen社製)に常法によりサブクローニングした。

【0120】

該サブクローニングにより得られた、配列番号6記載の塩基配列を有するプラスミドをpQEDXS-1と命名した。

(2) メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

E. coli W3110株(ATCC14948)を、LB液体培地に植菌し、対数増殖期まで培養した。

【0121】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体を、0.05M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) で洗浄後、菌体濃度が  $10^9$  細胞/ml になるように同緩衝液に懸濁した。

該懸濁液に NTG を終濃度が 600 mg/l になるように加え、室温で 20 分間保持して変異処理を行った。

【0122】

得られた変異処理菌体をメチルエリスリトール 0.1% を含む M9 最少寒天培地 [モレキュラー・クローニング 第二版] プレートに塗布し、培養した。メチルエリスリトールは、Tetrahedron Letters, 38, 35, 6184 (1997) に記載の方法に準じて化学合成した。

【0123】

メチルエリスリトール 0.1% を含む M9 最少寒天培地上で生育してきたコロニーを、M9 最少寒天培地とメチルエリスリトールを 0.1% 含む M9 最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを 0.1% 含む M9 最少寒天培地では生育できるが、M9 最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択した。

【0124】

該選択により得られたメチルエリスリトール要求性変異株 ME 7 株を以下の実験に用いた。

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

E. coli W3110 株 (ATCC14948) を LB 液体培地に植菌して対数増殖期まで培養した後、遠心分離して菌体を回収した。

【0125】

得られた菌体より、常法に従い染色体 DNA を単離・精製した。

該染色体 DNA 200  $\mu$ g を制限酵素 Sau3A I で部分消化し、得られた消化 DNA 断片を、シュクロース密度勾配超遠心分離 (26,000 rpm、20℃、20hr) により、サイズ分画した。

【0126】

該分画により取得された大きさが 4~6 kb の DNA 断片を、制限酵素 BamHI で消化したベクター pMW118 (ニッポンジーン社製) にライゲーション

ョンすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製した。

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたME 7株を常法に従い形質転換した。

【0127】

得られた形質転換体を、アンピシリン100  $\mu$ g/l入れたLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

該培養において生育してきた複数のコロニーからプラスミドを抽出して塩基配列を決定した。

【0128】

塩基配列を決定したクローンは配列番号10に示される塩基配列を含む配列を有していた。これらのプラスミドをpMEW41およびpMEW73と名づけた。

該配列を有するクローンの1株より抽出したプラスミドをpMEW73と命名した。pMEW73をHind IIIおよびSac Iで二重消化し、得られた配列番号10に示される塩基配列を有するHind III-Sac I処理DNA断片を広宿主域ベクターpEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)] のマルチクローニングサイトに連結してpEGYM1を作製した。

【0129】

上記Hind III-Sac I処理DNA断片をベクターpUC19 [Gene, 33, 103 (1985)] のHind III-Sac I部位に連結してpUCYM-1を作製した。

Genbankのデータベースに基づく大腸菌の染色体塩基配列情報より、ベクターに挿入されたDNA断片はyaeM遺伝子を含有することが分かった。

【0130】

yaeM遺伝子を十分発現させるような組換え体ベクターをPCR法 [Science, 230, 1350 (1985)] を用いて下記方法により構築した。

配列番号20に示した配列を有するセンスプライマーおよび配列番号21に示した配列を有するアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

【0131】

該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5' 末端にはそれぞれ

tac aaa ccc att gtc gcg att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat 1200

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr

385 390 395 400

gat cag gtg ctg cat gac gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc 1248

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe

405 410 415

gcc atc gac cgc gcg ggc att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag 1296

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln

420 425 430

ggt gct ttt gat ctc tct tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att 1344

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile

435 440 445

atg acc ccg agc gat gaa aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc 1392

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly

450 455 460

tat cac tat aac gat ggc ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac 1440

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn

465 470 475 480

B a m H I の制限酵素サイトを付加させた。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーおよびTaq DNA polymerase (Boelinger社製) を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマージャパン社製) でPCRを行うことによりyaeM遺伝子を増幅した。

【0132】

PCRは、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルと30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

増幅されたDNA断片およびpUC118 (宝酒造社製) を制限酵素B a m H I で消化後、各々のDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。

【0133】

これら精製された両断片を混合した後エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5  $\mu$  l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAがyaeM遺伝子であることをDNA配列を決定することによって確認した後、発現ベクターpQE30 (Qiagen社製) にサブクロニングした。

【0134】

得られた組換え体DNAをpQEYM1と命名した。

pQEYM1を用いて、ME7株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100  $\mu$  g / ml を含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

【0135】

該形質転換株は、野生型株と同程度の生育速度でコロニーを形成することが確認されたことより、yaeM遺伝子によりME7株の変異が相補されることが分かった。

【0136】

実施例2 組換え大腸菌によるコピキノン-8 (CoQ8) の生産

(1) 実施例1で取得したプラスミドpADO-1、pDXS-1、pXSE



-1 またはコントロールとして pEG400 を E. coli DH5 $\alpha$  株にそれぞれ導入し、100  $\mu$ g/ml 濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体 E. coli DH5 $\alpha$ /pAD0-1、E. coli DH5 $\alpha$ /pDXS-1、E. coli DH5 $\alpha$ /pXSE-1 および E. coli DH5 $\alpha$ /pEG400 を各々取得した。

【0137】

チアミン (thiamine) とビタミンB<sub>6</sub> をそれぞれ 100 mg/l、p-ヒドロキシ安息香酸 50 mg/l、スペクチノマイシン 100  $\mu$ g/ml 添加した LB 培地を 10 ml 入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で 72 時間振盪培養した。

【0138】

培養終了後、各々の培養液を 10 倍濃縮した。

各々の濃縮液 300  $\mu$ l に 2-ブタノール 300  $\mu$ l およびガラスビーズ 300  $\mu$ l を加え、マルチビーズショッカー MB-200 (安井器械社製) で 5 分間菌体破碎しつつ、イソプレノイド化合物の溶媒抽出を行った後、遠心分離により 2-ブタノール層を採取した。

【0139】

該ブタノール層中の CoQ8 を、高速液体クロマトグラフィー (LC-10A 島津製作所製) で定量分析することにより、形質転換体による CoQ8 の生産量を算定した。

カラムは Develosil ODS-HG-5 (野村化学) を用い、メタノール:n-ヘキサン = 8:2 の溶液を移動相とし、流速 1 ml/min、測定波長 275 nm の条件で分析した。

結果を第 1 表に示す。

【0140】

【表 1】

第 1 表 大腸菌形質転換株の C o Q 8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量*1
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ /pEG400	5.8	0.63	1.1
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ /pAD0-1	5.5	0.98	1.8
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ /pDXS-1	5.2	0.85	1.6
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ /pXSE-1	5.6	0.67	1.2

\* 1 : 菌体内含量は C o Q 8 生産量 [mg/L] を 10 倍した値を生育量 [OD660] で割った値で示した。

C o Q 8 の生成量は、コントロール株 DH5 $\alpha$ /pEG400 と比較し、DH5 $\alpha$ /pAD0-1、DH5 $\alpha$ /pDXS-1 および DH5 $\alpha$ /pXSE-1 では有意に高かった。特に、実施例 1 で取得した DNA を全て導入した DH5 $\alpha$ /pAD0-1 において最も高い生産性を得られた。

## 【0141】

(2) M9 培地を 10 ml 入れた試験管に、上記 (1) で取得した E. coli DH5 $\alpha$ /pDXS-1 または E. coli DH5 $\alpha$ /pEG400 をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、上記 (1) と同様の方法により形質転換体による C o Q 8 の生産量を算定した。

結果を第 2 表に示す。

## 【0142】

【表2】

第2表 大腸菌形質転換株のCoQ8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量*1
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pEG400	3.1	0.49	1.6
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pDXS-1	2.5	1.02	4.1

\*1 : 菌体内含量はCoQ8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

CoQ8の生成量は、コントロール株DH5 $\alpha$ /pEG400と比較し、DH5 $\alpha$ /pDXS-1では有意に高かった。

### (3) 組換え大腸菌によるCoQ8の生産

実施例1で取得したプラスミドpEGYM1またはコントロールとしてpEG400を*E. coli* DH5 $\alpha$ 株に導入し、100 $\mu$ g/ml濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体*E. coli* DH5 $\alpha$ /pEGYM1および*E. coli* DH5 $\alpha$ /pEG400を各々取得した。

#### 【0143】

グルコース1%、ビタミンB<sub>1</sub> 100mg/l、ビタミンB<sub>6</sub> 100mg/l、p-ハイドロキシ安息香酸 50mg/l添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、上記(1)と同様の方法により形質転換体によるCoQ8の生産量を算定した。

結果を第3表に示す。

#### 【0144】

## 【表 3】

第 3 表 大腸菌形質転換株の CoQ8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量*1
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pEG400	14.44	0.83	0.57
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pEGYM1	13.12	0.94	0.71

\* 1 : 菌体内含量は CoQ8 生産量 [mg/L] を 10 倍した値を生育量 [OD660] で割った値で示した。

CoQ8 の生成量は、コントロール株 DH5 $\alpha$ /pEG400 と比較し、DH5 $\alpha$ /pEGYM1 では有意に高かった。

## 【0145】

## 実施例 3 組換え大腸菌によるメナキノーン 8 (MK-8) の生産

(1) スペクチノマイシンを 100  $\mu$ g/ml 添加した TB 培地 [バクトトリプトン (ディフコ社製) 12 g、酵母エキス (ディフコ社製) 24 g、グリセロール 5 g を水 900 ml に溶解し、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 0.17 M、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を 0.72 M 含有する水溶液を 100 ml 加えて調製した培地] を 10 ml 入れた試験管に、実施例 2 (1) で取得した、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pADO-1 または *E. coli* DH5 $\alpha$ /pEG400 をそれぞれ植菌し、30℃ で 72 時間振盪培養した。

## 【0146】

培養終了後、実施例 2 (1) の CoQ8 の定量法と同様の方法により MK-8 を定量し、形質転換体による MK-8 の生産量を算定した。

結果を第 4 表に示す。

## 【0147】

【表 4】

第 4 表 大腸菌形質転換株の MK-8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量 <sup>*1</sup>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pEG400	23.2	1.1	0.46
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pADO-1	23.5	1.8	0.75

\* 1 : 菌体内含量は C o Q 8 生産量 [mg/L] を 10 倍した値を生育量 [OD660] で割った値で示した。

MK-8 の生産量は、コントロール株 DH5 $\alpha$ /pEG400 と比較して、DH5 $\alpha$ /pADO-1 では有意に高かった。

(2) 実施例 2 (1) で取得した *E. coli* DH5 $\alpha$ /pDXS-1 または *E. coli* DH5 $\alpha$ /pEG400 を、上記 (1) と同様の方法で培養し、形質転換体による MK-8 の生産量を算定した。

結果を第 5 表に示す。

【0148】

【表 5】

第 5 表 大腸菌形質転換株の MK-8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量 <sup>*1</sup>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pEG400	42.8	2.41	0.56
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pDXS-1	44.0	2.96	0.67

\* 1 : 菌体内含量は C o Q 8 生産量 [mg/L] を 10 倍した値を生育量 [OD660] で割った値で示した。

MK-8 の生産量は、コントロール株 DH5 $\alpha$ /pEG400 と比較して、DH5 $\alpha$ /pDXS-1 では有意に高かった。

【0149】

#### 実施例 4 *Erwinia car tovara* による C o Q 8 の生産

実施例 1 で取得したプラスミド pDXS-1 またはコントロールとして pE

G400をErwinia carotovora IF0-3380株に導入し、100  $\mu$ g/ml濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体IF0-3380/pDXS-1およびIF0-3380/pEG400を取得した。

【0150】

スペクチノマイシンを100  $\mu$ g/ml添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるC<sub>o</sub>Q<sub>8</sub>の生産量を算定した。

結果を第6表に示す。

【0151】

【表6】

第6表 Erwinia carotovora 形質転換株によるC<sub>o</sub>Q<sub>8</sub>生産

形質転換株	生育量 OD660	CoQ8生産量 mg/L	菌体内含量*1
IF0-3380/pEG400	1.68	0.26	1.5
IF0-3380/pDXS-1	2.48	0.45	1.8

\*1：菌体内含量はC<sub>o</sub>Q<sub>8</sub>生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C<sub>o</sub>Q<sub>8</sub>の生成量は、コントロール株IF0-3380/pEG400と比較し、IF0-3380/pDXS-1では有意に高かった。

【0152】

実施例5：Erwinia uredovoraによるユビキノンおよびカロテノイドの生産

実施例1で取得したプラスミドpUCYM-1、pQEDXS-1、pQEYM-1またはコントロールとしてpUC19およびpQE30をエレクトロポレーション法によりErwinia uredovora DSM-30080株に導入し、100  $\mu$ g/ml濃度のアンピシリンに抵抗性を示す形質転換体E. uredovora DSM-30080/pUCYM-1、E. uredovora DSM-30080/pQEDXS-1、E. uredovora DSM-30080/pQEYM-1、E. uredovora DSM-30080/pUC19およびE. uredovora DSM-30080/pQE30を取得した。

## 【0153】

アンピシリン 100  $\mu$ g/ml、グルコース1%、ビタミンB<sub>1</sub> 100 mg/l、ビタミンB<sub>6</sub> 100 mg/l、p-ハイドロキシ安息香酸 50 mg/l 添加したLB培地を10 ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

## 【0154】

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるCoQ8の生産量を算定した。

カロテノイド色素の生産量は、実施例2(1)と同様の方法により得られた2-ブタノール層を分光光度計を用い、450 nmの吸光度を測定することにより算出した。

結果を第7表に示す。

## 【0155】

## 【表7】

第7表 *E. uredo* 形質転換株によるCoQ8およびカロテノイド生産

形質転換株	生育量 OD <sub>660</sub>	CoQ8		カロテノイド	
		生産量 mg/L	菌体内含量比 相対値	生産量 相対値	菌体内含量比 相対値
DSM-30080/pUC19	2.00	1.15	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pUCYM-1	1.88	1.39	1.3	1.5	1.6
DSM-30080/pQE30	2.52	1.29	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pQEYM-1	1.92	1.36	1.4	1.7	2.2
DSM-30080/pQEDXS-1	2.12	3.21	3.0	5.6	6.7

CoQ8の生産量およびカロテノイド色素の生産量ともに、コントロール株DSM-30080/pUC19と比較し、DSM-30080/pUCYM-1では有意に高かった。

同様に、CoQ8の生産量およびカロテノイド色素の生産量ともに、コントロール株DSM-30080/pQE30と比較し、DSM-30080/pQEYM-1およびDSM-30080/pQEDXS-1では有意に高かった。

## 【0156】

## 実施例 6 yaeM 遺伝子がコードする酵素の活性測定

### (1) yaeM 遺伝子の高発現化

y a e M 遺伝子を十分発現させるような組換え体プラスミドを P C R 法 [Science, 230, 1350 (1985)] を用いて下記方法により構築した。

#### 【0157】

配列番号 24 に示した配列を有するセンスプライマーおよび配列番号 25 に示した配列を有するアンチセンスプライマーを DNA 合成機を用いて合成した。

該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの 5' 末端にはそれぞれ B a m H I の制限酵素サイトを付加させた。

#### 【0158】

染色体 DNA を鋳型として、これらプライマーおよび Taq DNA polymerase (パーリンガー社製) を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマージャパン社製) で P C R を行うことにより y a e M 遺伝子を増幅した。

P C R は、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルと30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

#### 【0159】

増幅された DNA 断片および pUC118 (宝酒造社製) を制限酵素 B a m H I で消化後、各々の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。

これら精製された両断片を混合した後エタノール沈殿を行い、得られた DNA 沈殿物を 5  $\mu$  l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体 DNA を取得した。

#### 【0160】

該組換え体 DNA が y a e M 遺伝子であることを DNA 配列を決定することによって確認した。

該組換え体からプラスミドを抽出し、制限酵素制限酵素 B a m H I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い B a m H I 処理 y a e M 遺伝子含有 DNA 断片を取得した。



【0161】

pQE30 (QIAGEN社製) を制限酵素 B a m H I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い B a m H I 処理pQE30断片を取得した。

上記で取得された B a m H I 処理 y a e M 遺伝子含有DNA断片を B a m H I 消化pQE30断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を 5  $\mu$  l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

【0162】

該組換え体DNAを用い、E. Coli JM109株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン 100  $\mu$  g / ml を含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

上記と同様の方法で、該大腸菌よりプラスミドを単離した。

【0163】

上記同様、該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpQEDXRと命名した。

(2) y a e M 遺伝子産物の活性測定

① y a e M 遺伝子産物の精製

(1) で作成したpQEDXRを常法によりpREP4を有するE. coli M15株(QIAGEN社製)に導入し、アンピシリン200  $\mu$  g / ml、カナマイシン25  $\mu$  g / mlに耐性を示すM15/pREP4+pQEDXR株を得た。

【0164】

M15/pREP4+pQEDXR株をアンピシリン 200  $\mu$  g / ml、カナマイシン 25  $\mu$  g / ml を含むLB液体培地 100 ml 中、37℃で培養し、660 nm の濁度が 0.8 に達した時点でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度 0.2 mM になるように添加した。さらに37℃で5時間培養した後、遠心分離 (3000 rpm、10分間) によって培養上清を除いた。この菌体を 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 6 ml に懸濁し、超音波破碎機 (SONIFIER, BRANSON社製) を用いて氷冷しつつ破碎した。得られた菌体破碎液を遠心分離 (10

、000rpm、20分間、4℃) にか、上清を回収した。この細胞抽出液遠心上清をNi-NTAレジンカラム(QIAGEN社製)に通し、20mlの洗浄緩衝液〔100mM トリス塩酸(pH 8.0)、50mM イミダゾール、0.5% Tween20〕で洗浄した。ついで溶出緩衝液〔100mM トリス塩酸(pH 8.0)、200mM イミダゾール〕10mlを通塔し、溶出液を1mlづつ分画した。

【0165】

各分画について蛋白量を測定(BioRad社の蛋白量定量キット使用)し、蛋白質を含む画分を精製蛋白画分とした。

② 基質1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸の調製

反応基質である1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸は以下のようにして調製した。1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸の検出は、HPLC〔カラム: Senshu pak NH2-1251-N(4.6 x 250mm、Senshu社製)、移動層: 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.5)〕によって195nmの吸光度を測定する方法で行った。

【0166】

大腸菌のdxs遺伝子を高発現するプラスミドpQDXS-1を上記と同様にE. coli M15/pREP4株に導入し、M15/pREP4+pQDXS-1株を得た。

該株を実施例6(2)①と同様に培養し、Ni-NTAレジンカラムを用いてdxs酵素蛋白質を精製した。

【0167】

該精製dxs蛋白質を20mlの反応液〔100mM トリス塩酸(pH 7.5)、10mM ピルビン酸ナトリウム、30mM DL-グリセルアルデヒド-3-リン酸、1.5mM チアミンピロリン酸、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DL-ジチオスレイトール〕に加え37℃で保温した。

【0168】

12時間反応した後、反応液を水で300mlに希釈し、活性炭カラム(2.2 x 8cm)を通した後、Dowex 1-X8(C1-型、3.5 x 25cm)に通塔し、1%食塩水で溶出した。溶出画分を濃縮後、Sephadex G-10(1.8 x

100 cm)に通塔し、水で溶出した。1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸含有画分を凍結乾燥し、約50 mgの白色粉末を得た。

【0169】

該粉末が1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸であることをNMR分析(A-500、日本電子社製)で確認した。

③ yaeM遺伝子産物の酵素活性測定

100 mM トリス塩酸 (pH 7.5)、1 mM  $MgCl_2$ 、0.3 mM NADPHと実施例2(1)で得たyaeM遺伝子産物を含む反応液1 mlに、上記のように合成した1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸0.3 mM(終濃度)を加え、37℃でインキュベートした。インキュベート中のNADPHの増減を340 nmの吸光を分光光度計(UV-160、島津社製)で測定する方法で追跡したところ、経時的にNADPHが減少することが分かった。

【0170】

上記反応産物の構造を確認するため、以下のようにスケールを大きくして反応を行い、産物を単離した。1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸の濃度を0.15 mMとした以外は上記と同じ組成の反応液200 mlを、同様に37℃で30分間インキュベートした後、その全量を活性炭カラムに通し、通過液を水で1 Lに希釈した後、Dowex 1-X8 (Cl-型、3.5 x 20 cm)カラムに通塔した。

【0171】

1%食塩水400 mlで溶出し、Sephadex G-10 (1.8 x 100 cm)に通塔し、水で溶出した。溶出画分を凍結乾燥することで、反応産物を単離した。

HR-FABMS解析から単離された反応産物の分子式は $C_5H_{12}O_7P$  [ $m/z$  215.0276 ( $M-H$ )<sup>-</sup>、 $\Delta$ -4.5 mmu]と推定された。<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMR解析から、以下のケミカルシフトが得られた。

【0172】

<sup>1</sup>H NMR( $D_2O$ , 500 MHz):  $\delta$  4.03(ddd,  $J=11.5, 6.5, 2.5$  Hz, 1H), 3.84(ddd,  $J=11.5, 8.0, 6.5$  Hz, 1H), 3.78(dd,  $J=8.0, 2.5$  Hz, 1H), 3.60(d,  $J=12.0$  Hz, 1H), 3.50(d,  $J=12.0$  Hz, 1H), 1.15(s, <sup>3</sup>H); <sup>13</sup>C NMR( $D_2O$ , 125 MHz):  $\delta$  75

.1(C-2), 74.8(C-3), 67.4(C-1), 65.9(C-4), 19.4(2-Me)

この反応産物をアルカリ性ホスファターゼ(宝酒造社製)で処理して得られる化合物を $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$  NMR解析して得られるケミカルシフトは、Tetrahedron Letter, 38, 6184 (1997)に記載の方法で合成した2-C-メチル-D-エリスリトールのNMR解析で得られるケミカルシフトと完全に一致した。

#### 【0173】

さらに前者の旋光度は $[\alpha]_D^{21} = +6.0$  ( $c=0.050$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )で、報告されている[Tetrahedron Letter, 38, 6184 (1997)] 2-C-メチル-D-エリスリトールの旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +7.0$  ( $c=0.13$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )と一致した。

これらの結果から、yaeM遺伝子産物の反応産物は2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸であることが明らかになった。即ち、yaeM遺伝子産物はNADPHの消費を伴いながら1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる活性を有することが判明した。この触媒活性に基づき、本酵素を1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼと命名した。

#### 【0174】

④ 1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの性質

実施例2(3)に記した1ml反応系を用いて、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの酵素学的性質を調べた。なお1uとは1分間に1mmolのNADPHを酸化する活性と定義する。

#### 【0175】

NADPHをNADHに置換した場合、活性は1/100以下に低下した。

1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸の代りに1-デオキシ-D-キシロースを用いると全く反応は起らなかった。

SDS-PAGE解析から、本酵素は42kDaポリペプチドから構成さ

れていることが分かった。

反応系への金属添加効果を第8表に示した。

【0176】

【表8】

第8表 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼ  
活性に及ぼす各種金属イオンの影響

添加物	比活性 (units/mg protein)
なし	0.3
EDTA	N. D.
MnCl <sub>2</sub>	11.8
CoCl <sub>2</sub>	6.0
MgCl <sub>2</sub>	4.0
CaCl <sub>2</sub>	0.2
NiSO <sub>4</sub>	0.2
ZnSO <sub>4</sub>	0.3
CuSO <sub>4</sub>	N. D.
FeSO <sub>4</sub>	N. D.

各種金属イオンおよび EDTA は 1mM になるように添加した。  
N. D. は活性が検出できなかったことを示す。

【0177】

MnCl<sub>2</sub> 存在下での 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸、NAD  
PH への K<sub>m</sub> は、それぞれ 249 μM、7.4 μM だった。

反応温度の影響を図1に、反応 pH の影響を図2に示した。

【0178】

実施例7 yaeM 欠損変異株の作成と性質

(1) yaeM 欠損変異株の作成

1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼが細胞の  
生育に必須か否かを調べるため、以下のようにしてその欠損変異株を作成した

【0179】

yaem遺伝子中に挿入するためのカナマイシン耐性遺伝子カセットを以下のようにして作成した。

実施例1(2)②で得たプラスミドpMEW41を制限酵素Ba1Iで消化後アガロースゲル電気泳動し、Ba1I処理DNA断片を取得した。

【0180】

Tn5を制限酵素HindIIIとSamIで消化した後、DNA blunting kit(宝酒造社製)を用いて断片の末端を平滑化した。

得られた平滑化DNA断片を先に作成したBa1I処理pMEW41DNA断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 $\mu$ lの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

【0181】

該組換え体DNAを用い、E. coli JM109株(宝酒造より購入)を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100 $\mu$ g/mlとカナマイシン15 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

生育してきたアンピシリン耐性の形質転換体のコロニー数個について、アンピシリン100 $\mu$ g/mlとカナマイシン15 $\mu$ g/mlを含むLB液体培地10mlで37℃16時間振盪培養した。

【0182】

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpMEW41Kmと名づけた。

【0183】

pMEW41Kmを用いて、相同組換えによる染色体上のyaem遺伝子の破壊を行った。組換えの模式図を図3に示した。

pMEW41Kmを制限酵素HindIIIとSacIで消化し、アガロースゲル電気泳動を行い直鎖状の断片を精製した。この断片を用いて常法に従って、大腸

菌FS1576株を形質転換した。FS1576株は国立遺伝学研究所よりME9019株の名で入手可能である。該形質転換体をカナマイシン $15\mu\text{g}/\text{ml}$ と2-C-メチル-D-エリスリトール $1\text{g}/\text{l}$ を含むLB寒天培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。

【0184】

生育してきたカナマイシン耐性コロニー数個について、カナマイシン $15\mu\text{g}/\text{ml}$ と2-C-メチル-D-エリスリトール $1\text{g}/\text{l}$ を含むLB液体培地 $10\text{ml}$ で $37^{\circ}\text{C}$ 16時間振盪培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

【0185】

該菌体より常法に従って染色体DNAを単離した。

染色体DNAを制限酵素 Sma I または Pst I で消化した。またFS1576株の染色体についても同様に処理した。常法に従って、これら制限酵素処理DNAをアガロースゲル電気泳動後、カナマイシン耐性遺伝子および yaeM 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析に供した。その結果、カナマイシン耐性コロニーの染色体は図3に示した構造をとっており、目的どおり yaeM 遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子で分断破壊されていることが確かめられた。

【0186】

(2) yaeM 欠損変異株の性質

上記の手順で作成された yaeM 欠損株およびその親株であるFS1576株を、LB寒天培地および2-C-メチル-D-エリスリトール $1\text{g}/\text{l}$ を含むLB寒天培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$ で培養した。2日後の生育度合いを第9表に示した。

【0187】

【表 9】

第 9 表 大腸菌の生育に対する yaeM 遺伝子の欠損の影響

菌株	各培地上での菌の生育 <sup>*1</sup>	
	L B	L B + ME <sup>*2</sup>
FS1576	+	+
yaeM 欠損株	—	+

\* 1 : 生育度合い + ; 良好に生育、- ; 生育せず

\* 2 : ME は 2-C-メチル-D-エリスリトール 1g/l 添加を表す。

【0188】

y a e M 欠損変異株は 2-C-メチル-D-エリスリトールを添加しない培地では生育できないため、2-C-メチル-D-エリスリトール非存在下では本遺伝子が細胞の生育に必須であることが明白となった。

従って、y a e M (1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼ) の活性を阻害する物質は有効な抗菌剤あるいは除草剤となり得る。

【0189】

【発明の効果】

本発明によれば、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関与する DNA を 1 つ以上含む DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA を 1 つ以上含む DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法、および該蛋白質、ならびに 1



ーデオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する新規な酵素蛋白質および該酵素を阻害する物質を探索することによる、抗菌およびまたは除草活性を有する化合物の探索方法を提供することができる。

【0190】

「配列表フリーテキスト」

配列番号12-人工配列の説明：合成DNA

配列番号13-人工配列の説明：合成DNA

配列番号14-人工配列の説明：合成DNA

配列番号15-人工配列の説明：合成DNA

配列番号16-人工配列の説明：合成DNA

配列番号17-人工配列の説明：合成DNA

配列番号18-人工配列の説明：合成DNA

配列番号19-人工配列の説明：合成DNA

配列番号20-人工配列の説明：合成DNA

配列番号21-人工配列の説明：合成DNA

配列番号22-人工配列の説明：合成DNA

配列番号23-人工配列の説明：合成DNA

配列番号24-人工配列の説明：合成DNA

配列番号25-人工配列の説明：合成DNA

【0191】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> A METHOD OF PRODUCING ISOPRENOIDO COMPAUND

<130> H10-110N2

<140>

<141>

<150> H10-103101

<151> 1998-04-14

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 1 9 2 】

<210> 1

<211> 620

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser



特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val

165

170

175

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu

180

185

190

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu

195

200

205

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu

210

215

220

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly

225

230

235

240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly

245

250

255

His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu

260

265

270

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr

275

280

285

Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe

290

295

300

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pr Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser

305

310

315

320

Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp

325

330

335

Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met

340

345

350

Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile

355

360

365

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly

370

375

380

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr

385

390

395

400

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe

405

410

415

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln

420

425

430

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile

435

440

445

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly

450

455

460

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pr Arg Gly Asn

465                      470                      475                      480

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys

485                      490                      495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly

500                      505                      510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr

515                      520                      525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu

530                      535                      540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala

545                      550                      555                      560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His

565                      570                      575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile

580                      585                      590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala

595                      600                      605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala

610                      615                      620

【0193】

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln

1 5 10 15

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val

20 25 30

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg

35 40 45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser

65 70 75 80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg

85 90 95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu

100 105 110

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala

115

120

125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu

130

135

140

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu

145

150

155

160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg

165

170

175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu

180

185

190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu

195

200

205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp

210

215

220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly

225

230

235

240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu

245

250

255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln

260

265

270



Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu  
 275 280 285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys  
 290 295

【0194】

<210> 3

<211> 80

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser  
 1 5 10 15

Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu  
 20 25 30

Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln  
 35 40 45

Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu  
 50 55 60

Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu  
 65 70 75 80

【0195】

<210> 4

<211> 348

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr

1 5 10 15

Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys

20 25 30

Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly

35 40 45

Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser

50 55 60

Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp

65 70 75 80

Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg

85 90 95

Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys

100 105 110

Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln  
115 120 125

Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr  
130 135 140

Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu  
145 150 155 160

Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg  
165 170 175

Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu  
180 185 190

Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp  
195 200 205

His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu  
210 215 220

Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg  
225 230 235 240

Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser  
245 250 255

Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala

特平 1 0 - 2 2 1 9 1 0

260

265

270

Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr

275

280

285

Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala

290

295

300

Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu

305

310

315

320

Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu

325

330

335

Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys

340

345

【 0 1 9 6 】

<210> 5

<211> 398

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 5

Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser

1

5

10

15

Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala

20

25

30

Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu

35

40

45

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu

50

55

60

Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser

65

70

75

80

Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln

85

90

95

Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala

100

105

110

Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu

115

120

125

Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala

130

135

140

Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu

145

150

155

160

Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn

165

170

175

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu

180

185

190

Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg

195

200

205

His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr

210

215

220

Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn

225

230

235

240

Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile

245

250

255

His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly

260

265

270

Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn

275

280

285

Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala

290

295

300

Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu

305

310

315

320

Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn

325

330

335

Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg

340

345

350

Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp

355

360

365

Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn

370

375

380

Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser

385

390

395

【 0 1 9 7 】

<210> 6

<211> 1860

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1860)

<400> 6

atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc 48

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

1

5

10

15

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys

20

25

30

gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggc 144

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly

35

40

45

cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His

50

55

60

tat gtc tac aac acc ccg ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggc cat 240

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His

65

70

75

80

cag gct tat ccg cat aaa att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc 288

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly

85

90

95

acc atc cgt cag aaa ggc ggt ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa 336

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu



100

105

110

agc gaa tat gac gta tta agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt 384

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser

115

120

125

gcc gga att ggt att gcg gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc 432

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg

130

135

140

cgc acc gtc tgt gtc att ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg 480

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala

145

150

155

160

ttt gaa gcg atg aat cac gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg 528

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val

165

170

175

att ctc aac gac aat gaa atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc 576

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu

180

185

190

aac aac cat ctg gca cag ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg 624

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu

195

200

205

cgc gaa ggc ggg aaa aaa gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag 672

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu

210

215

220

ctg ctc aaa cgc acc gaa gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc 720

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly

225

230

235

240

acg ttg ttt gaa gag ctg ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt 768

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly

245

250

255

cac gat gtg ctg ggg ctt atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg 816

His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu

260

265

270

aaa ggc ccg cag ttc ctg cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat 864

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr

275

280

285

gaa ccg gca gaa aaa gac ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt 912

Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe

290

295

300

gat ccc tcc agc ggt tgt ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc 960

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser

305

310

315

320

tat tca aaa atc ttt ggc gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac 1008

Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp

325

330

335

aac aag ctg atg gcg att act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg 1056

Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met

340

345

350

gtc gag ttt tca cgt aaa ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att 1104

Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile

355

360

365

gcc gag caa cac gcg gtg acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg 1152

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly

370

375

380

gcg gtc ggc gtg gaa ctg acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa 1488

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys

485

490

495

ggc att gtg aag cgt cgt ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt 1536

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly

500

505

510

acg ctg atg cca gaa gcg gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg 1584

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr

515

520

525

ctg gtc gat atg cgt ttt gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg 1632

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu

530

535

540

gaa atg gcc gcc agc cat gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc 1680

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala

545

550

555

560

att atg ggc ggc gca ggc agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat 1728

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His

565

570

575

cgt aaa cca gta ccc gtg ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att 1776

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile

580

585

590

ccg caa gga act cag gaa gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc 1824

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala

595

600

605

gct ggt atg gaa gcc aaa atc aag gcc tgg ctg gca 1860

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala

610

615

620

【 0 1 9 8 】

<210> 7

<211> 897

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(897)

<400> 7

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag 48

Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln

1 5 10 15

gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg 96

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val

20 25 30

gtc gaa acc atg cag tat gcc gca tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga 144

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg

35 40 45

cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt cat atg ttc gcc gtt agc aca aac 192

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn

50 55 60

acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc gtt gag tgt atc cac gct tac tca 240

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser

65 70 75 80

tta att cat gat gat tta ccg gca atg gat gat gac gat ctg cgt cgc 288

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg

85 90 95

ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc 336

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu

100

105

110

gct ggc gac gct tta caa acg ctg gcg ttc tcg att tta agc gat gcc 384

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala

115

120

125

gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc gac aga att tcg atg att tct gaa 432

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu

130

135

140

ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc gga atg tgc ggt ggt cag gca tta 480

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu

145

150

155

160

gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt 528

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg

165

170

175

att cat cgt cat aaa acc ggc gca ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt 576

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

180

185

190

ggt gca tta agc gcc gga gat aaa gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc 624

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu

195

200

205

gac aag tat gca gag agc atc ggc ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac 672

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp

210

215

220

atc ctg gat gtg gtg gga gat act gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt 720

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly

225

230

235

240

gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt 768

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu

245

250

255

gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg gat ctg atc gac gat gcc cgt cag 816

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln

260

265

270

tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa 864



Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu

275

280

285

gcg cta gcg gac tac atc atc cag cgt aat aaa

897

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys

290

295

【 0 1 9 9 】

<210> 8

<211> 240

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(240)

<400> 8

atg ccg aag aaa aat gag gcg ccc gcc agc ttt gaa aag gcg ctg agc 48

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser

1

5

10

15

gag ctg gaa cag att gta acc cgt ctg gaa agt ggc gac ctg ccg ctg 96

Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu

20

25

30

特平 1 0 - 2 2 1 9 1 0

gaa gag gcg ctg aac gag ttc gaa cgc ggc gtg cag ctg gca cgt cag 144

Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln

35

40

45

ggg cag gcc aaa tta caa caa gcc gaa cag cgc gta caa att ctg ctg 192

Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu

50

55

60

tct gac aat gaa gac gcc tct cta acc cct ttt aca ccg gac aat gag 240

Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu

65

70

75

80

【0 2 0 0】

<210> 9

<211> 1044

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1044)

<400> 9

gtg act ggg gtg aac gaa tgc agc cgc agc aca tgc aac ttg aag tat 48

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr

1 5 10 15

gac gag tat agc agg agt ggc agc atg caa tac aac ccc tta gga aaa 96

Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys

20 25 30

acc gac ctt cgc gtt tcc cga ctt tgc ctc ggc tgt atg acc ttt ggc 144

Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly

35 40 45

gag cca gat cgc ggt aat cac gca tgg aca ctg ccg gaa gaa agc agc 192

Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser

50 55 60

cgt ccc ata att aaa cgt gca ctg gaa ggc ggc ata aat ttc ttt gat 240

Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp

65 70 75 80

acc gcc aac agt tat tct gac ggc agc agc gaa gag atc gtc ggt cgc 288

Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg

85 90 95

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

gca ctg cgg gat ttc gcc cgt cgt gaa gac gtg gtc gtt gcg acc aaa 336

Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys

100

105

110

gtg ttc cat cgc gtt ggt gat tta ccg gaa gga tta tcc cgt gcg caa 384

Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln

115

120

125

att ttg cgc tct atc gac gac agc ctg cga cgt ctc ggc atg gat tat 432

Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr

130

135

140

gtc gat atc ctg caa att cat cgc tgg gat tac aac acg ccg atc gaa 480

Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu

145

150

155

160

gag acg ctg gaa gcc ctc aac gac gtg gta aaa gcc ggg aaa gcg cgt 528

Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg

165

170

175

tat atc ggc gcg tca tca atg cac gct tcg cag ttt gct cag gca ctg 576

Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu

180

185

190

gaa ctc caa aaa cag cac ggc tgg gcg cag ttt gtc agt atg cag gat 624

Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp

195

200

205

cac tac aat ctg att tat cgt gaa gaa gag cgc gag atg cta cca ctg 672

His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu

210

215

220

tgt tat cag gag ggc gtg gcg gta att cca tgg agc ccg ctg gca agg 720

Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg

225

230

235

240

ggc cgt ctg acg cgt ccg tgg gga gaa act acc gca cga ctg gtg tct 768

Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser

245

250

255

gat gag gtg ggg aaa aat ctc tat aaa gaa agc gat gaa aat gac gcg 816

Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala

260

265

270

cag atc gca gag cgg tta aca ggc gtc agt gaa gaa ctg ggg gcg aca 864

Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

275

280

285

cga gca caa gtt gcg ctg gcc tgg ttg ttg agt aaa ccg ggc att gcc 912

Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala

290

295

300

gca ccg att atc gga act tcg cgc gaa gaa cag ctt gat gag cta ttg 960

Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu

305

310

315

320

aac gcg gtg gat atc act ttg aag ccg gaa cag att gcc gaa ctg gaa 1008

Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu

325

330

335

acg ccg tat aaa ccg cat cct gtc gta gga ttt aaa 1044

Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys

340

345

【 0 2 0 1 】

<210> 10

<211> 1194

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1194)

<400> 10

atg aag caa ctc acc att ctg ggc tcg acc ggc tcg att ggt tgc agc 48

Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser

1

5

10

15

acg ctg gac gtg gtg cgc cat aat ccc gaa cac ttc cgc gta gtt gcg 96

Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro. Glu His Phe Arg Val Val Ala

20

25

30

ctg gtg gca ggc aaa aat gtc act cgc atg gta gaa cag tgc ctg gaa 144

Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu

35

40

45

ttc tct ccc cgc tat gcc gta atg gac gat gaa gcg agt gcg aaa ctt 192

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu

50

55

60

ctt aaa acg atg cta cag caa cag ggt agc cgc acc gaa gtc tta agt 240

Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser

65

70

75

80

ggg caa caa gcc gct tgc gat atg gca gcg ctt gag gat gtt gat cag 288

Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln

85

90

95

gtg atg gca gcc att gtt ggc gct gct ggg ctg tta cct acg ctt gct 336

Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala

100

105

110

gcg atc cgc gcg ggt aaa acc att ttg ctg gcc aat aaa gaa tca ctg 384

Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu

115

120

125

gtt acc tgc gga cgt ctg ttt atg gac gcc gta aag cag agc aaa gcg 432

Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala

130

135

140

caa ttg tta ccg gtc gat agc gaa cat aac gcc att ttt cag agt tta 480

Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu

145

150

155

160

ccg caa cct atc cag cat aat ctg gga tac gct gac ctt gag caa aat 528

Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn



165

170

175

ggc gtg gtg tcc att tta ctt acc ggg tct ggt ggc cct ttc cgt gag 576

Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu

180

185

190

acg cca ttg cgc gat ttg gca aca atg acg ccg gat caa gcc tgc cgt 624

Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg

195

200

205

cat ccg aac tgg tcg atg ggg cgt aaa att tct gtc gat tcg gct acc 672

His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr

210

215

220

atg atg aac aaa ggt ctg gaa tac att gaa gcg cgt tgg ctg ttt aac 720

Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn

225

230

235

240

gcc agc gcc agc cag atg gaa gtg ctg att cac ccg cag tca gtg att 768

Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile

245

250

255

cac tca atg gtg cgc tat cag gac ggc agt gtt ctg gcg cag ctg ggg 816

His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly

特平 1 0 - 2 2 1 9 1 0

260

265

270

gaa ccg gat atg gta cgc caa ttg ccc aca cca tgg gca tgg ccg aat 864

Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn

275

280

285

cgc gtg aac tct ggc gtg aag ccg ctc gat ttt tgc aaa cta agt gcg 912

Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala

290

295

300

ttg aca ttt gcc gca ccg gat tat gat cgt tat cca tgc ctg aaa ctg 960

Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu

305

310

315

320

gcg atg gag gcg ttc gaa caa ggc cag gca gcg acg aca gca ttg aat 1008

Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn

325

330

335

gcc gca aac gaa atc acc gtt gct gct ttt ctt gcg caa caa atc cgc 1056

Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg

340

345

350

ttt acg gat atc gct gcg ttg aat tta tcc gta ctg gaa aaa atg gat 1104

Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp

355

360

365

atg cgc gaa cca caa tgt gtg gac gat gtg tta tct gtt gat gcg aac 1152

Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn

370

375

380

gcg cgt gaa gtc gcc aga aaa gag gtg atg cgt ctc gca agc 1194

Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser

385

390

395

【 0 2 0 2 】

<210> 11

<211> 4390

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (208)..(447)

<220>

<221> CDS

<222> (450)..(1346)

<220>

<221> CDS

<222> (1374)..(3233)

<220>

<221> CDS

<222> (3344)..(4390)

<400> 11

atggcggcaa tggttcgttg gcaagcctta agcgacttgt atagggaaaa atacagcagc 60

ccacacctgc ggctgcatcc aggcgcgga gtataccact aacatcgctt tgctgtgcac 120

atcaccttac cattgcgcgt tatttgctat ttgccctgag tccgttacca tgacggggcg 180

aaaaatattg agagtcagac attcatt atg ccg aag aaa aat gag gcg ccc gcc 234

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala

1

5

agc ttt gaa aag gcg ctg agc gag ctg gaa cag att gta acc cgt ctg 282

Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu

10

15

20

25

gaa agt ggc gac ctg ccg ctg gaa gag gcg ctg aac gag ttc gaa cgc 330

Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg  
30 35 40

ggc gtg cag ctg gca cgt cag ggg cag gcc aaa tta caa caa gcc gaa 378

Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu  
45 50 55

cag cgc gta caa att ctg ctg tct gac aat gaa gac gcc tct cta acc 426

Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr  
60 65 70

cct ttt aca ccg gac aat gag ta atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa 473

Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu  
75 80 1 5

gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca 521

Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro  
10 15 20

ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg gtc gaa acc atg cag tat ggc gca 569

Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala  
25 30 35 40

tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt 617

Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly

45 50 55

cat atg ttc ggc gtt agc aca aac acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc 665

His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala

60 65 70

gtt gag tgt atc cac gct tac tca tta att cat gat gat tta ccg gca 713

Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala

75 80 85

atg gat gat gac gat ctg cgt cgc ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag 761

Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys

90 95 100

ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc gct ggc gac gct tta caa acg ctg 809

Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu

105 110 115 120

gcg ttc tcg att tta agc gat gcc gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc 857

Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg

125 130 135

gac aga att tcg atg att tct gaa ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc 905

Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala

140

145

150

gga atg tgc ggt ggt cag gca tta gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac 953

Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His

155

160

165

gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt att cat cgt cat aaa acc ggc gca 1001

Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala

170

175

180

ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt ggt gca tta agc gcc gga gat aaa 1049

Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys

185

190

195

200

gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc gac aag tat gca gag agc atc ggc 1097

Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly

205

210

215

ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac atc ctg gat gtg gtg gga gat act 1145

Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr

220

225

230

特平 1 0 - 2 2 1 9 1 0

gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt 1193

Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser  
235 240 245

acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg 1241

Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg  
250 255 260

gat ctg atc gac gat gcc cgt cag tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag 1289

Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln  
265 270 275 280

tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa gcg cta gcg gac tac atc atc cag 1337

Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln  
285 290 295

cgt aat aaa taaacaataa gtattaatag gccctg atg agt ttt gat att gcc 1391

Arg Asn Lys Met Ser Phe Asp Ile Ala  
1 5

aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc acc cag gag tta cga ctg 1439

Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser Thr Gln Glu Leu Arg Leu



10

15

20

ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc gac gaa ctg cgc cgc tat 1487

Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys Asp Glu Leu Arg Arg Tyr

25

30

35

tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg cac ttc gcc tcc ggg ctg 1535

Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly His Phe Ala Ser Gly Leu

40

45

50

ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac tat gtc tac aac acc ccg 1583

Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Tyr Val Tyr Asn Thr Pro

55

60

65

70

ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggg cat cag gct tat ccg cat aaa 1631

Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln Ala Tyr Pro His Lys

75

80

85

att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc acc atc cgt cag aaa ggc 1679

Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly Thr Ile Arg Gln Lys Gly

90

95

100

ggc ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa agc gaa tat gac gta tta 1727

Gly Leu His Pro Phe Pr Trp Arg Gly Glu Ser Glu Tyr Asp Val Leu

特平 10-221910

105

110

115

agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt gcc gga att ggt att gcg 1775

Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala Gly Ile Gly Ile Ala

120

125

130

gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc cgc acc gtc tgt gtc att 1823

Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg Arg Thr Val Cys Val Ile

135

140

145

150

ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg ttt gaa gcg atg aat cac 1871

Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala Phe Glu Ala Met Asn His

155

160

165

gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg att ctc aac gac aat gaa 1919

Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val Ile Leu Asn Asp Asn Glu

170

175

180

atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc aac aac cat ctg gca cag 1967

Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu Asn Asn His Leu Ala Gln

185

190

195

ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg cgc gaa ggc ggg aaa aaa 2015

Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu Arg Glu Gly Gly Lys Lys  
200 205 210

gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag ctg ctc aaa cgc acc gaa 2063

Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu Leu Leu Lys Arg Thr Glu  
215 220 225 230

gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc acg ttg ttt gaa gag ctg 2111

Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu  
235 240 245

ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt cac gat gtg ctg ggg ctt 2159

Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asp Val Leu Gly Leu  
250 255 260

atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg aaa ggc ccg cag ttc ctg 2207

Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu Lys Gly Pro Gln Phe Leu  
265 270 275

cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat gaa ccg gca gaa aaa gac 2255

His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr Glu Pro Ala Glu Lys Asp  
280 285 290

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt gat ccc tcc agc ggt tgt 2303

Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe Asp Pro Ser Ser Gly Cys  
295 300 305 310

ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc tat tca aaa atc ttt ggc 2351

Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser Tyr Ser Lys Ile Phe Gly  
315 320 325

gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac aac aag ctg atg gcg att 2399

Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp Asn Lys Leu Met Ala Ile  
330 335 340

act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg gtc gag ttt tca cgt aaa 2447

Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met Val Glu Phe Ser Arg Lys  
345 350 355

ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att gcc gag caa cac gcg gtg 2495

Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile Ala Glu Gln His Ala Val  
360 365 370

acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg tac aaa ccc att gtc gcg 2543

Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Ile Val Ala  
375 380 385 390

att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat gat cag gtg ctg cat gac 2591

Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr Asp Gln Val Leu His Asp  
395 400 405

gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc gcc atc gac cgc gcg ggc 2639

Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly  
410 415 420

att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag ggt gct ttt gat ctc tct 2687

Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln Gly Ala Phe Asp Leu Ser  
425 430 435

tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att atg acc ccg agc gat gaa 2735

Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile Met Thr Pro Ser Asp Glu  
440 445 450

aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc tat cac tat aac gat ggc 2783

Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly Tyr His Tyr Asn Asp Gly  
455 460 465 470

ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac gcg gtc ggc gtg gaa ctg 2831

Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Ala Val Gly Val Glu Leu

475

480

485

acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa ggc att gtg aag cgt cgt 2879

Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys Gly Ile Val Lys Arg Arg

490

495

500

ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt acg ctg atg cca gaa gcg 2927

Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly Thr Leu Met Pro Glu Ala

505

510

515

gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg ctg gtc gat atg cgt ttt 2975

Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr Leu Val Asp Met Arg Phe

520

525

530

gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg gaa atg gcc gcc agc cat 3023

Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu Glu Met Ala Ala Ser His

535

540

545

550

gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc att atg ggc ggc gca ggc 3071

Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala Ile Met Gly Gly Ala Gly

555

560

565

agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat cgt aaa cca gta ccc gtg 3119

Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His Arg Lys Pro Val Pr Val

570

575

580

ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att ccg caa gga act cag gaa 3167

Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile Pro Gln Gly Thr Gln Glu

585

590

595

gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc gct ggt atg gaa gcc aaa 3215

Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala Ala Gly Met Glu Ala Lys

600

605

610

atc aag gcc tgg ctg gca taatccctac tccactcctg ctatgcttaa 3263

Ile Lys Ala Trp Leu Ala

615

620

gaaattattc atagactcta aataattcga gttgcaggaa ggcggaac gagtgaagcc 3323

ccaggagctt acataagtaa gtg act ggg gtg aac gaa tgc agc cgc agc aca 3376

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr

1

5

10

tgc aac ttg aag tat gac gag tat agc agg agt ggc agc atg caa tac 3424

Cys Asn Leu Lys Tyr Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr

特平 1 0 - 2 2 1 9 1 0

15

20

25

aac ccc tta gga aaa acc gac ctt cgc gtt tcc cga ctt tgc ctc ggc 3472

Asn Pro Leu Gly Lys Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly

30

35

40

tgt atg acc ttt ggc gag cca gat cgc ggt aat cac gca tgg aca ctg 3520

Cys Met Thr Phe Gly Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu

45

50

55

ccg gaa gaa agc agc cgt ccc ata att aaa cgt gca ctg gaa ggc ggc 3568

Pro Glu Glu Ser Ser Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly

60

65

70

75

ata aat ttc ttt gat acc gcc aac agt tat tct gac ggc agc agc gaa 3616

Ile Asn Phe Phe Asp Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu

80

85

90

gag atc gtc ggt cgc gca ctg cgg gat ttc gcc cgt cgt gaa gac gtg 3664

Glu Ile Val Gly Arg Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val

95

100

105

gtc gtt gcg acc aaa gtg ttc cat cgc gtt ggt gat tta ccg gaa gga 3712



Val Val Ala Thr Lys Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly

110

115

120

Ytta tcc cgt gcg caa att ttg cgc tct atc gac gac agc ctg cga cgt 3760

Leu Ser Arg Ala Gln Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg

125

130

135

ctc ggc atg gat tat gtc gat atc ctg caa att cat cgc tgg gat tac 3808

Leu Gly Met Asp Tyr Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr

140

145

150

155

aac acg ccg atc gaa gag acg ctg gaa gcc ctc aac gac gtg gta aaa 3856

Asn Thr Pro Ile Glu Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys

160

165

170

gcc ggg aaa gcg cgt tat atc ggc gcg tca tca atg cac gct tcg cag 3904

Ala Gly Lys Ala Arg Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln

175

180

185

ttt gct cag gca ctg gaa ctc caa aaa cag cac ggc tgg gcg cag ttt 3952

Phe Ala Gln Ala Leu Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe

190

195

200

gtc agt atg cag gat cac tac aat ctg att tat cgt gaa gaa gag cgc 4000

特平 1 0 — 2 2 1 9 1 0

Val Ser Met Gln Asp His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg  
205 210 215

gag atg cta cca ctg tgt tat cag gag ggc gtg gcg gta att cca tgg 4048

Glu Met Leu Pro Leu Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp  
220 225 230 235

agc ccg ctg gca agg ggc cgt ctg acg cgt ccg tgg gga gaa act acc 4096

Ser Pro Leu Ala Arg Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr  
240 245 250

gca cga ctg gtg tct gat gag gtg ggg aaa aat ctc tat aaa gaa agc 4144

Ala Arg Leu Val Ser Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser  
255 260 265

gat gaa aat gac gcg cag atc gca gag cgg tta aca ggc gtc agt gaa 4192

Asp Glu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu  
270 275 280

gaa ctg ggg gcg aca cga gca caa gtt gcg ctg gcc tgg ttg ttg agt 4240

Glu Leu Gly Ala Thr Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser  
285 290 295

aaa ccg ggc att gcc gca ccg att atc gga act tcg cgc gaa gaa cag 4288

Lys Pro Gly Ile Ala Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln

300 305 310 315

ctt gat gag cta ttg aac gcg gtg gat atc act ttg aag ccg gaa cag 4336

Leu Asp Glu Leu Leu Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln

320 325 330

att gcc gaa ctg gaa acg ccg tat aaa ccg cat cct gtc gta gga ttt 4384

Ile Ala Glu Leu Glu Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe

335 340 345

aaa taa 4390

Lys

【 0 2 0 3 】

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 12

ccggatccat ggcggcaatg gttcgttggc aag

33

【 0 2 0 4 】

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 13

ccgaattctt atttaaattcc tacgacagga tgcg

34

【 0 2 0 5 】

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripti n of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 14

ccggatccat gagttttgat attgccaaat acc

33

【 0 2 0 6 】

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 15

ccgaattctt atgccagcca ggccttgatt ttg

33

【 0 2 0 7 】

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 16

ccgaattctt actcattgtc cggtgtaaaa ggg

33

【 0 2 0 8 】

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> ¥ <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

ccggatccat ggactttccg cagcaactcg aag

33

【 0 2 0 9 】

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

ccgaattctt atttattacg ctggatgatg tag

33

【 0 2 1 0 】

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 19

ccggatccta atccctactc cactcctgct atg

33

【 0 2 1 1 】

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 20

gggggatcca agcaactcac cattctgggc

30

【 0 2 1 2 】

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 21

gggggatccg cttgcgagac gcatcacctc

30

【 0 2 1 3 】

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 22

gggggatcca gttttgatat tgccaaatac cc

32

【 0 2 1 4 】

<210> 23



<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 23

gggggatcct gccagccagg ccttgatttt gg

32

【 0 2 1 5 】

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 24

gggggatccg agcaactcac cattctgggc

30

【 0 2 1 6 】

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 25

gggggatccg cttgcgagac gcatcacctc

30

【図面の簡単な説明】

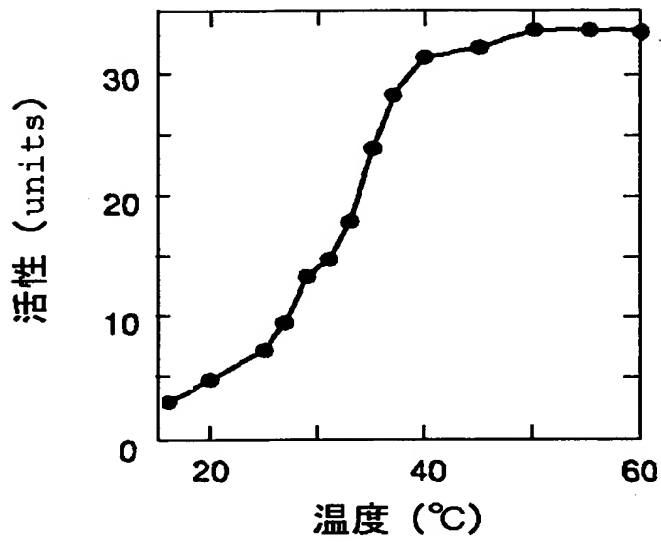
【図 1】 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼの活性に対する反応温度の影響を示した図である。

【図 2】 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼの活性に対する反応液 pH の影響を示した図である。100 mM トリス塩酸緩衝液中の各 pH における活性を示した。pH 8.0 の活性を 100% として、各 pH における活性を相対活性として示した。

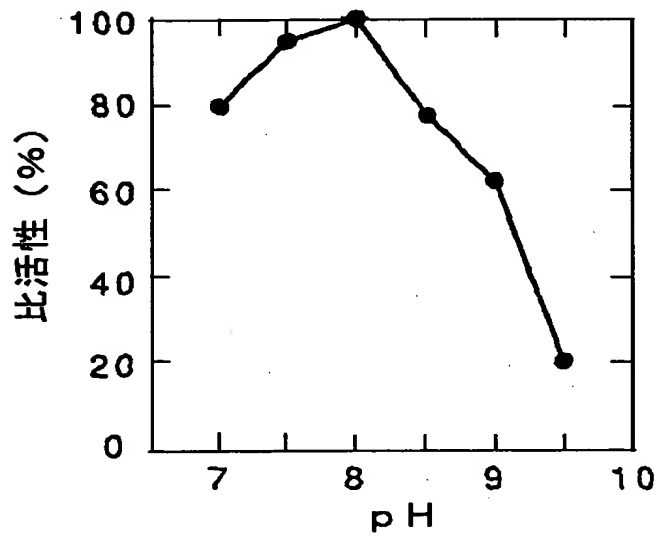
【図 3】 相同組換えを利用した染色体上の yaeM 遺伝子破壊方法を示した図である。

【書類名】 図面

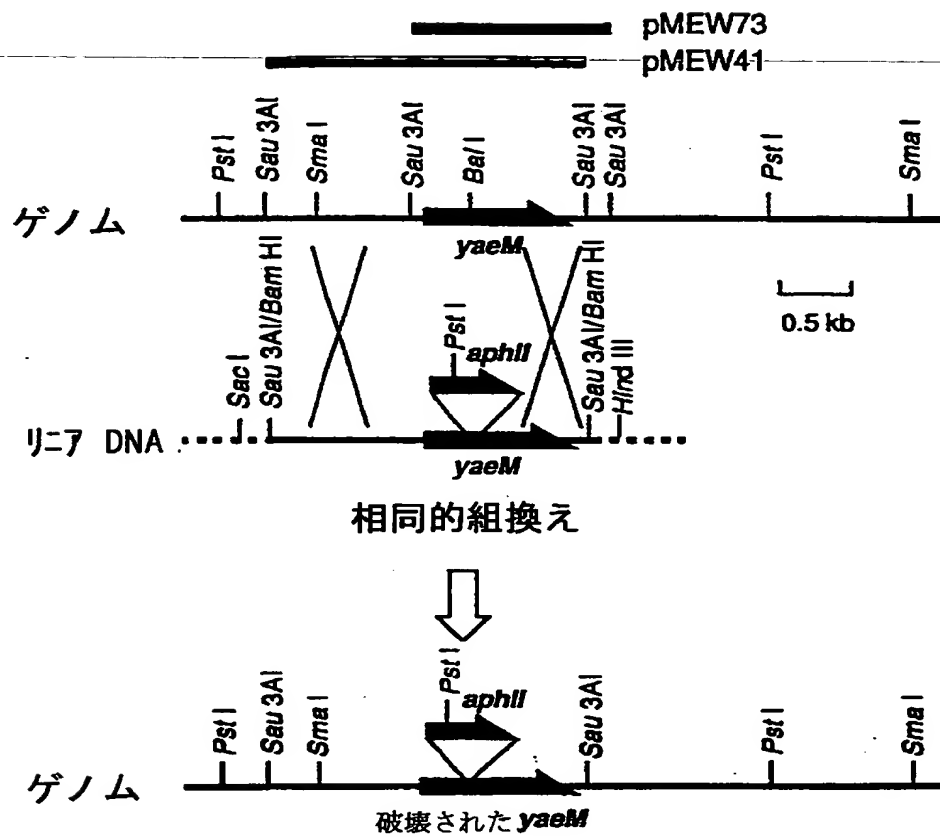
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の製造法、抗菌剤および除草剤を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質あるいはイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質あるいはイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、該蛋白質あるいはイソプレノイド化合物の製造法、該DNA、該蛋白質、非メバロン酸経路上の酵素反応を阻害する物質を探索することを特徴とする、抗菌および除草活性物質の探索方法、該方法により取得される抗菌物質および除草活性物質を提供することができる。

【選択図】 なし

特平 10-221910

【書類名】	職権訂正データ
【訂正書類】	特許願

<認定情報・付加情報>

---

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000001029
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
【氏名又は名称】	協和醗酵工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名	協和醗酵工業株式会社

